

小鼠甲基丙二酸 (MMA) ELISA 试剂盒

本试剂盒仅供科研使用

- 1、查看 ELISA 实验常见问题请登录: http://www.yfxbio.com/articLe.asp?m_id=122
- 2、参考翼飞雪 ELISA 试剂盒引用文献请登录: http://www.yfxbio.com/articLe.asp?m_id=138

试剂盒编号: YFXEM00838

试剂盒适用: 小鼠血液、组织、细胞上清、体液等标本中甲基丙二酸 (MMA) 的含量。

一、试剂盒组成

试剂盒成分	96 孔	48 孔	储存温度
说明书	1 份	1 份	
封板膜	2 片 (48)	2 片 (96)	
密封袋	1 个	1 个	
微孔酶标板	12 孔 × 8 条	12 孔 × 4 条	2-8℃
标准品	0.3mL*6 管	0.3mL*6 管	2-8℃
注: 标准品 (S0-S5) 浓度依次为: 0ng/L、34.375ng/L、68.75ng/L、137.5ng/L、275ng/L、550ng/L。			
样本稀释液	6mL	3mL	2-8℃
检测抗原-HRP	6mL	3mL	2-8℃
20× 洗涤缓冲液	25mL	15mL	2-8℃
注: 20× 洗涤缓冲液使用前用蒸馏水按 1: 20 的比例稀释, 即 1 份的 20× 洗涤缓冲液加 19 份的蒸馏水。			
底物 A	6mL	3mL	2-8℃
底物 B	6mL	3mL	2-8℃
终止液	6mL	3mL	2-8℃

二、实验原理

试剂盒采用竞争法酶联免疫吸附试验 (ELISA)。往预先包被 甲基丙二酸 (MMA) 抗体的包被微孔中, 依次加入标本、标准品、HRP 标记的竞争抗原, 经过温育并彻底洗涤。用底物 TMB 显色, TMB 在过氧化物酶的催化下转化成蓝色, 并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅和样品中的 甲基丙二酸 (MMA) 呈负相关。用酶标仪在 450nm 波长下测定吸光度 (OD 值), 计算样品浓度。

三、自备试剂耗材

酶标仪 (450nm), 高精度加样器及枪头: 0.5-10 μ L、2-20 μ L、20-200 μ L、200-1000 μ L, 37℃ 恒温箱。

四、样本处理要求

- 1、血清: 室温血液自然凝固 10-20 分钟, 离心 20 分钟左右 (2000-3000 转/分)。仔细收集上清, 保存过程中如出现沉淀, 应再次离心。
- 2、血浆: 应根据标本的要求选择 EDTA 或柠檬酸钠作为抗凝剂, 混合 10-20 分钟后, 离心 20 分钟左右 (2000-3000 转/分)。仔细收集上清, 保存过程中如有沉淀形成, 应再次离心。

- 3、尿液：用无菌管收集，离心 20 分钟左右（2000-3000 转/分）。仔细收集上清，保存过程中如有沉淀形成，应再次离心。胸腹水、脑脊液参照实行。
- 4、细胞：检测分泌性的成份时，用无菌管收集，离心 20 分钟左右（2000-3000 转/分）。仔细收集上清。检测细胞内的成份时，用 PBS (PH7.2-7.4) 稀释细胞悬液，细胞浓度达到 100 万/mL 左右。通过反复冻融，以使细胞破坏并放出细胞内成份。离心 20 分钟左右（2000-3000 转/分）。仔细收集上清。保存过程中如有沉淀形成，应再次离心。
- 5、组织标本：切割标本后，称取重量。加入一定量的 PBS，PH7.4（建议组织重量与 PBS 体积比例为 1:9，即 1g 组织，加入 9mL PBS）。用液氮迅速冷冻保存备用。标本融化后仍然保持 2-8℃ 的温度。加入一定量的 PBS (PH7.4)，用手工或匀浆器将标本匀浆充分。离心 20 分钟左右（2000-3000 转/分）。仔细收集上清。分装后一份待检测，其余冷冻备用。
- 6、标本采集后尽早进行提取，提取按相关文献进行，提取后应尽快进行实验。若不能马上进行试验，可将标本放于 -20℃ 保存，但应避免反复冻融。
- 7、不能检测含 NaN₃ 的样品，因 NaN₃ 抑制辣根过氧化物酶的（HRP）活性。

五、洗板方法

- 1、手工洗板：甩尽孔内液体，每孔加满洗涤液，静置 1min 后甩尽孔内液体，在吸水纸上拍干，如此洗板 5 次。
- 2、自动洗板机：每孔注入洗液 350μL，浸泡 1min，洗板 5 次。

六、操作步骤

- 1、从室温平衡 20min 后的铝箔袋中取出所需板条，剩余板条用自封袋密封放回 4℃。
- 2、设置标准品孔和样本孔，标准品孔各加不同浓度的标准品 50μL。
- 3、样本孔先加待测样本 10μL，再加样本稀释液 40μL；空白孔不加。
- 4、除空白孔外，标准品孔和样本孔中每孔加入辣根过氧化物酶（HRP）标记的检测抗体 100μL，用封板膜封住反应孔，37℃ 水浴锅或恒温箱温育 60min。
- 5、弃去液体，吸水纸上拍干，每孔加满洗涤液，静置 1min，甩去洗涤液，吸水纸上拍干，如此重复洗板 5 次（也可用洗板机洗板）。
- 6、每孔加入底物 A、B 各 50μL，37℃ 避光孵育 15min。
- 7、每孔加入终止液 50μL，15min 内，在 450nm 波长处测定各孔的 OD 值。

七、结果判断

- 1、15 分钟内在波长 450nm 的酶标仪上读取各孔的 OD 值。
- 2、百分结合率计算：设 S₀ 管计数为 B₀，各标准管或样品管计数为 B，非特异管计数为 NSB，则百分结合率计算公式如下： $B/B_0 = (B - NSB)/(B_0 - NSB) \times 100\%$ 。
- 3、logit 计算：各标准点或样品管的 logit 值计算公式如下： $\text{logit} = \ln(B/B_0)/(1 - B/B_0)$ 。
- 4、将标准品的 OD 均值与标准品 0 点的 OD 均相除，为标准点的百分结合率，在 log-logit 坐标纸上绘图。
- 5、Log-logit 双对数标准曲线：坐标纸上横轴从左至右第一个 1-9 表示为第一个 10 进位，第二个 1-9 表示为第二个 10 进位。第三个 1-9 表示为第三个 10 进位。坐标纸纵轴为百分比 (1-99)，即各标准吸光值的百分结合率。取一条通过各点的直线。要求尽可能多的点在线上，同时剩余的点均匀分布在直线的两边。样品也同样由吸光值计算百分结合率，再从纵轴上的相应结合率找到直线上的点，此点对应的横坐标浓度即为样品的浓度，无须换算。

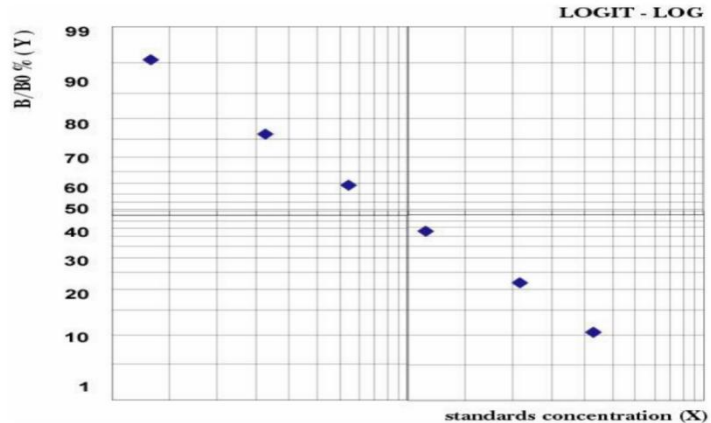
6、人工处理：以标准浓度取 log 值为横坐标，对应的 logit 值为纵坐标在普通坐标纸上或以标准浓度为横坐标，对应的 B/B0 为纵坐标在 logit-log 坐标纸上画出标准曲线（理想化时是一条直线）。根据待测样

品的 B/B0 可以从坐标纸上查出样品的浓度值。如果使用普通坐标纸，查出的数值应取反对数才是最后的浓度值。

7、自动处理：使用 logit-log 或四参数数据处理模式，由电脑自动计算得出结果。

8、敏感度：0.1ng/L。

9、图例：



八、试剂盒性能

- 1、准确性：标准品线性回归与预期浓度相关系数 R 值 ≥ 0.9900 。
- 2、灵敏度：最低检测浓度小于 0.1ng/L。
- 3、检测范围：10-550ng/L。
- 4、特异性：不与其它可溶性结构类似物交叉反应。
- 5、重复性：板内、板间变异系数均小于 15%。
- 6、贮藏：2-8℃，避光防潮保存。
- 7、有效期：6 个月。

九、注意事项

- 1、试剂盒保存在 2-8℃，使用前室温平衡 20 分钟。从冰箱取出的浓缩洗涤液会有结晶，这属于正常现象，水浴加热使结晶完全溶解后再使用。
- 2、实验中不用的板条应立即放回自封袋中，密封（低温干燥）保存。
- 3、浓度为 0 的 S0 号标准品即可视为阴性对照或者空白；按照说明书操作时样本已经稀释 5 倍，最终结果乘以 5 才是样本实际浓度。
- 4、严格按照说明书中标明的时间、加液量及顺序进行温育操作。
- 5、所有液体组分使用前充分摇匀。

十、免责声明

- 1、试剂盒仅供研究使用，不得用于临床实验或人体实验，否则所产生的一切后果，由实验者承担，本公司概不负责。
- 2、严格按照说明书操作，实验者违反说明书操作，后果由实验者承担。